

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОПРОТЕИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫСЫ: ВЛИЯНИЕ СИМПАТИЧЕСКОЙ И ПАРАСИМПАТИЧЕСКОЙ ДЕНЕРВАЦИИ ПЕЧЕНИ, ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ И ИНТРАПОРТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АТРОПИНА

Парфенова Н.С., Кузнецов А.С.

Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Резюме

Изучали физико-химические свойства липопропротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и двух форм липопропротеидов высокой плотности (ЛПВП) - Апо А- и Апо Е-богатой в плазме крови крыс после симпатической и парасимпатической денервации печени, частичной гепатэктомии и интрапортального введения атропина. Поверхностный потенциал ЛПОНП и Е-ЛПВП во всех экспериментальных группах был значительно ниже, чем в контроле, но наиболее выраженное снижение наблюдалось после интрапортального введения атропина и через неделю после 70%-й гепатэктомии. Радиус частиц ЛПОНП и Е-ЛПВП значительно снизился после 70%-й гепатэктомии и интрапортального введения атропина, в меньшей степени - после перерезки чревных нервов и ваготомии, тогда как радиус частиц А-ЛПВП не изменился. Вязкость ядра ЛПОНП и А-ЛПВП увеличилась после симпатической денервации печени, гепатэктомии и ваготомии, причем степень увеличения для ЛПОНП при этих воздействиях была большей, чем для А-ЛПВП. В Е-ЛПВП этот параметр оставался неизменным. Доля белка в водном окружении в ЛПОНП и Е-ЛПВП была большей после ваготомии и введения атропина и не менялась в случае билатеральной перерезки чревных нервов и гепатэктомии. В А-ЛПВП этот параметр был постоянным.

Так как все названные параметры отражают сборку, структуру и трансформацию ЛП, наши результаты подтверждают предположение, что автономные нейрональные факторы влияют на продукцию ЛП в печени, действуя на посттранскрипционном уровне.

Ключевые слова: печень, денервация, гепатэктомия, атропин, липопропротеиды.

В настоящее время внимание исследователей всего мира приковано к изучению конкретных нейрорегуляторных механизмов, обеспечивающих функционирование тканей в норме и патологии. Вегетативная нервная система, берущая свое начало в гипоталамусе, вовлечена в регуляцию метаболизма, модулируя различные метаболические пути, такие, как продукция глюкозы печенью, утилизация глюкозы различными тканями, липолиз и липогенез в бурой и белой жировой ткани. [1,2,3,4,5]. Эти метаболические регуляции базируются на реципрокности симпатической и парасимпатической нервной системы. Вместе с тем, регуляция обмена липопропротеидов (ЛП) симпатическими и парасимпатическими нейрональными факторами остается совершенно неизученной. Мы изучали физико-химические свойства липопропротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и двух форм липопропротеидов высокой плотности (ЛПВП) - Апо А- и Апо Е-богатой в плазме крови крыс после симпатической и парасимпатической денервации печени, частичной гепатэктомии и интрапортального введения атропина.

Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах-самцах весом 180-200 г.

Билатеральную перерезку чревных нервов производили за брюшиной с помощью бинокулярной лупы. 70%-я гепатэктомия также использовалась как модель десимпатизации (содержание норадреналина в регенерирующей

печени резко падает). Для парасимпатической денервации печени производили двустороннюю поддиафрагмальную ваготомию. Атропин вводили интрапортально из расчета 0,2-0,4 мг на кг веса. Для наркотизации животных вводили барбитал внутривенно в дозе 50 мг на 1 кг веса. Животных брали в опыт через неделю после операции.

Общую фракцию ЛП, полученную ультрацентрифугированием в плотности $d=1,21$ г/мл, разделяли на сефарозе 6В на ЛПОНП и ЛПВП [6], затем последние разделяли на гепарин-сефарозе, чтобы получить Апо А- и Апо Е-богатые ЛПВП [7]. Свойства ЛП оценивались с помощью флуоресцентных зондов: 8-анилинонафталинсульфонат - для измерения поверхностного потенциала, антрацен и п-терфенил - для измерения радиуса частиц, пирен - для определения их микровязкости. Тушение триптофана пиреном использовали для определения доли белка в водном окружении [8].

Результаты и обсуждение

Поверхностный потенциал ЛПОНП и Е-ЛПВП во всех экспериментальных группах был значительно ниже, чем в контроле, но наиболее выраженное снижение наблюдалось после интрапортального введения атропина - на 27,8% и 21,4%, и через неделю после 70%-й гепатэктомии - на 25,2% и 19,1%, соответственно. В А-ЛПВП этот параметр существенно не изменялся (рис. 1).

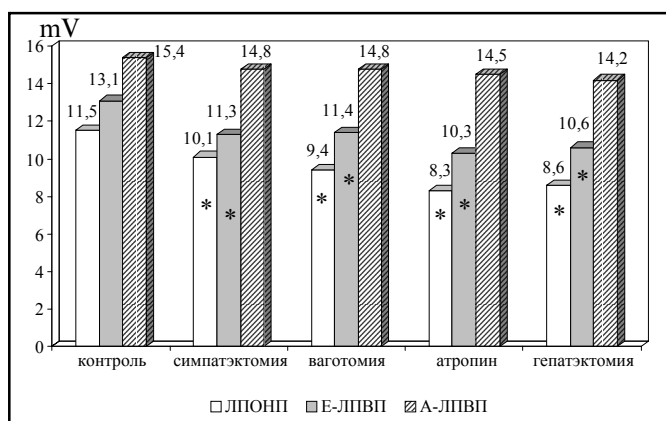


Рис. 1. Поверхностный потенциал изучаемых фракций липопротеидов при различных воздействиях на печень (n=15)

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

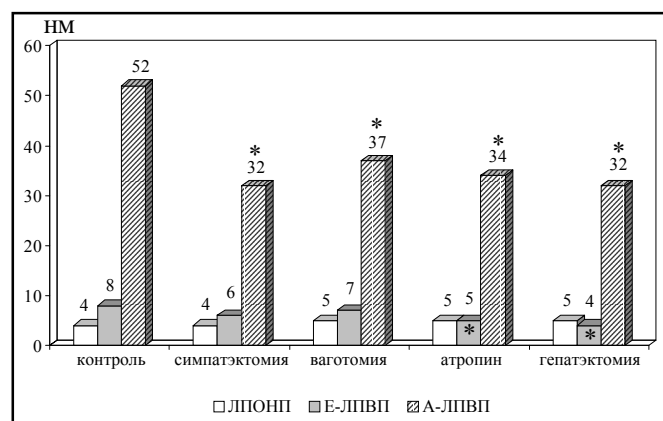


Рис. 2. Радиус частиц (п-терфенил → антрацен) изучаемых фракций липопротеидов при различных воздействиях на печень (n=15)

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Радиус частиц ЛПОНП и Е-ЛПВП значительно снизился после гепатэктомии - на 38,5% и 50% и интрапортального введения атропина - на 34,6% и 37,5%, в меньшей степени - через 7 дней после перерезки чревных нервов и ваготомии, тогда как радиус частиц А-ЛПВП не изменился (рис. 2).

Вязкость ядра ЛПОНП и А-ЛПВП увеличилась после симпатической денервации печени, 70%-й гепатэктомии и ваготомии. Причем степень увеличения для ЛПОНП при этих воздействиях была большей (37,5%, 34,4%, и 31,3%), чем для А-ЛПВП (11%, 9,8% и 9,8%, соответственно). Что касается Е-ЛПВП, то этот параметр оставался неизменным (рис. 3).

Доля белка в водном окружении в ЛПОНП и Е-ЛПВП была большей после ваготомии (на 23,3% и 66,7%) и введения атропина (на 10,8% и 50%) и не менялась в случае билатеральной перерезки чревных нервов и гепатэктомии. В А-ЛПВП этот параметр был постоянным (рис. 4).

На данном этапе исследования трудно объяснить направленность тех или иных изменений. Однако, так как все эти параметры отражают сборку, структуру и трансформацию ЛП, мы можем предположить, что автономные нейрональные факторы влияют на продукцию ЛП в печени, действуя на посттранскрипционном уровне. Фракции липопротеидов ЛПОНП и ЛПВП были выбраны нами не случайно - большая часть их пула синтезируется именно в печени. [9]. В дальнейшем мы планируем провести фармакологический анализ, используя избирательно действующие симпато-, адрено- и холинолитики.

Из исследований последних десятилетий очевидно, что процессы паракринной и аутокринной регуляции, сигнальные молекулы, к которым относятся цитокины, простаноиды, симпатические нейропептиды печени (галанин, нейропептид Y), иначе называемые ко-трансммиттерами, субстанция Р, находятся под контролем факторов гипоталамической нейрональной природы. Морфологическими методами

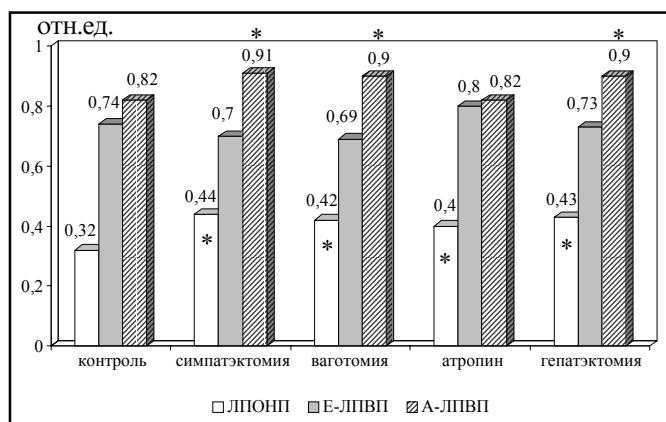


Рис. 3. Вязкость ядра изучаемых фракций липопротеидов при различных воздействиях на печень (n=15)

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

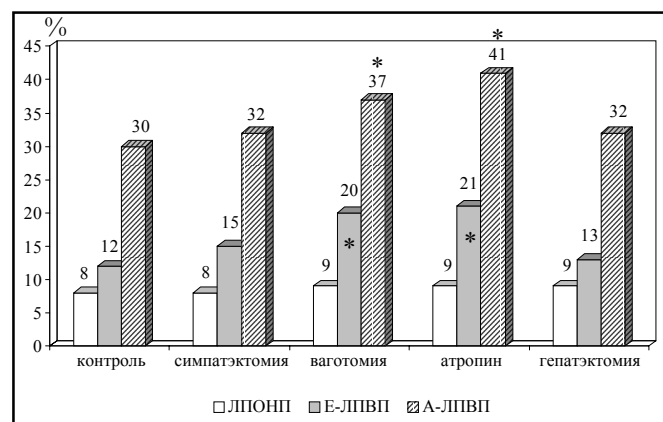


Рис. 4. Доля белка в водном окружении (триптофан → пириден) изучаемых фракций липопротеидов при различных воздействиях на печень (n=15)

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

установлено, что паренхиматозные клетки печени снабжены симпатическими и парасимпатическими нервными окончаниями [10, 11]. До последнего времени оставалось неясным, как осуществляются трофические влияния на обменные процессы в тканях. Совсем недавно описано функционирование щелевых контактов печени (gap junctions), которые связывают сигнал, поступающий по вегетативным нервам и определенные метаболические пути [5]. По существующим представлениям именно ко-трансммиттеры, которые обнаружены как в адренергических, так и в холинергических нервах, осуществляют метаболическую функцию вегетативной нервной системы. Интересно отметить, что в

регенерирующей печени крысы содержание основного белка gap junctions - коннексина 32 - значительно снижается [12], что подтверждает правомочность выбранной нами модели десимпатизации путем гепатэктомии.

В настоящей работе нам удалось показать, что даже такие тонкие биофизические характеристики липопротеидов как поверхностный потенциал, радиус частиц, микровязкость, доля белка в водном окружении - находятся под контролем нейрорегуляторных факторов, что в дальнейшем позволит подойти к вопросу о нарушениях регуляции обмена липопротеидов вегетативной нервной системой, лежащих в основе атерогенеза.

Литература

1. Парфенова Н.С. Влияние двусторонней поддиафрагмальной ваготомии на активность некоторых ферментов энергетического обмена в печени. // Бюлл. эксп. биол. мед. - 1976; 82(7): 814-816.
2. Шаныгина К.И., Парфенова Н.С. Влияние перерезки чревных и блуждающих нервов на активность и изоферментный состав лактатдегидрогеназы печени крыс. // Вопр. мед. химии. - 1977; 23(5): 650-652.
3. Shimazu T., Fujimoto T. Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. III. Differential effects of sympathetic-nerve stimulation and of catecholamines on liver phosphorylase. // Biochim. Biophys. Acta. - 1968; 165:349-356.
4. Shinazu T. Innervation of the liver and glucoregulation: roles of the hypothalamus and autonomic nerves. // Nutrition. - 1996; 12:65-66.
5. Shimazu T. Progress and perspective of neuro-hepatology. / In: Liver Innervation and the Neural Control of Hepatic Function, edited by T. Shimazu, John Libbey, London. - 1996; - pp. 3-13.
6. Ha Y.C., Barter P.Y. Rapid separation of plasma lipoproteins by gel permeation chromatography on agarose gel superose 6 B. // J. Chromatogr. - 1985; 341(1):154-157.
7. Weisgraber K.H., Mahley R.N. Subfraction of high density lipoproteins by heparin-sepharose affinity chromatography. // J. Lipid. Res. - 1980; 21(3):316-325.
8. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и цитопроотеидов. / М. - "Наука", 1989, 277с.
9. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. / СПб - "Питер Ком", 1999, 512с.
10. Metz W., Forssman W.G. Comparative morphology of liver innervation. / In: Communications of liver cells, eds. H. Popper, L. Bianchi, F. Gudat and W. Reutter, Lancaster: MTP Press. - 1980; - pp. 121-127.
11. Tsuneki K., Ichihara K. Electron microscope study of vertebrate liver innervation. // Arch. Histol. Jpn. - 1981; 44:1-13.
12. Miyashita T., Takeda A., Iwai M., Shimazu T. Single administration of hepatotoxic chemicals transiently decreases the gap-junction-protein levels of connexin 32 in rat liver. // Eur. J. Biochem. - 1991; 196:37-42.

Abstract

Physical-chemical properties of very low density (VLDL) and two forms of high density lipoproteins (LP) - apo E-rich HDL and apo A-rich HDL in rat blood plasma after sympathetic and parasympathetic denervation of the liver, partial hepatectomy and intraportal atropine administration were investigated. Surface potential of VLDL and E-HDL in all experimental groups was significantly lower than in sham operated controls, but the most pronounced decrease was after intraportal atropine administration and in 7 days after partial hepatectomy. In A-HDL this parameter was essentially the same. VLDL and E-HDL particle radius significantly decreased after 70% hepatectomy and intraportal atropine administration, was slightly lower in 7 days after section of splanchnic nerves and vagotomy and was invariable in the case of A-HDL. VLDL and A-HDL lipid microviscosity increased after sympathetic denervation, partial hepatectomy and vagotomy. The degree of increase for VLDL under such conditions was higher than for A-HDL. As to E-HDL this parameter did not change. Percent of protein in water equipment in VLDL and E-HDL was greater after vagotomy and atropine administration and did not change in case of bilateral section of splanchnic nerves and hepatectomy. In A-HDL, this parameter was constant.

As all these parameters reflect the LP assembling, structure and transformation, our results confirm the suggestion that autonomic neuronal factors influence the LP production, acting on post-transcriptional processes.

Keywords: liver, denervation, hepatectomy, atropine, lipoproteins.

Поступила 28/08-2000